

На правах рукописи



НГУЕН ТХИ НГА

**ХАРАКТЕРИСТИКА СООБЩЕСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ
ЭПИТЕЛИЯ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА
ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ**

03.02.03 – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2015

Работа выполнена в лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор,
академик АН РТ **Ильинская Ольга Николаевна**

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор кафедры
госпитальной терапии ГБОУ ВПО «Казанский
государственный медицинский университет»
Министерства Здравоохранения РФ,
Абдулхаков Рустем Аббасович

кандидат биологических наук, доцент ГБОУ ДПО
«Казанская государственная медицинская академия
Министерства Здравоохранения РФ,
Морозова Лидия Григорьевна

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки
«Казанский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека, г. Казань

Защита диссертации состоится « 18 » февраля 2016 г. в ___ ч. на заседании
диссертационного совета Д.212.081.08 при ФГАОУ ВО «Казанский
(Приволжский) федеральный университет» по адресу: г. Казань, ул. Карла
Маркса, 74, аудитория 205.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И.
Лобачевского при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный
университет» по адресу: г. Казань, ул. Кремлевская, д.35.

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор



З.И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

Человека принято рассматривать как надорганизм, который характеризуется совокупностью соотношения между микробными клетками и клетками самого организма [Sekirov, 2006, Gill et al., 2006, Maccaferri et al., 2011]. Разнообразие микробиома человека очень велико, при этом показана его значительная вариабельность между индивидуумами [Eckburg, 2005, Goodacre, 2007]. Исследование микробиома можно считать новой эрой для понимания значения микрофлоры в поддержании здорового статуса человека.

В последние десятилетия происходит увеличение частоты возникновения колоректального рака (КРР). Среди онкологических заболеваний КРР вышел на четвертое место во всем мире и на первое место в Республике Татарстан. На основе многих исследований показали, что дисбактериоз кишечника тесно связан с развитием КРР. Однако, еще не ясно, служит ли нарушение баланса кишечной микрофлоры непосредственным фактором возникновения и развития онкологического заболевания, или это нарушение является следствием колоректального рака. Современные исследования показывают, что особенности микрофлоры пациентов с КРР могут служить диагностическим маркером заболевания [Zhiguang, 2015]. На сегодняшний день имеются данные, подтверждающие проонкогенную роль энтеротоксигенных групп бактерий *Escherichia-Schigella* и *Bacteroides fragilis* [Dejea et al., 2013; Kostic et al., 2013, Sears et al., 2014]. В то же время известно, что метагеномные исследования нормофлоры выявили значительное разнообразие ее состава, как у различных индивидуумов, так и в популяциях людей, живущих на различных территориях [Tyakht, 2013]. Тем не менее, неясно, насколько отличается количественный и качественный состав кишечной микрофлоры в очаге поражения и на нормальном эпителии пациентов с КРР. Поэтому исследование данной микрофлоры, а также выявление ее функциональных отличий является чрезвычайно актуальной проблемой, решение которой позволит обнаружить как маркерно-диагностические показатели, так и наметить целевые микроорганизмы как потенциальные мишени действия противоопухолевых препаратов.

В связи с вышеизложенным, представляет значительный интерес сравнительный анализ особенностей сообщества микроорганизмов, плотно ассоциированных с нормальным и трансформированным эпителием толстой и прямой кишки пациентов с диагностированным КРР.

Целью исследования является сравнительная характеристика сообщества микроорганизмов, плотно ассоциированных с нормальным и трансформированным эпителием прямой кишки пациентов с диагностированным колоректальным раком.

В соответствии с поставленной целью решались следующие **задачи**:

1. Выделить и идентифицировать факультативно аэробные гетеротрофные культивируемые бактерии из биоптатов нормального и малигнизированного эпителия кишечника пациентов, подвергшихся операционной элиминации карциномы прямой кишки;
2. Определить физиолого-биохимические особенности выделенных штаммов: гемолитическую и рибонуклеазную активности, устойчивость к антибиотикам различных классов;
3. Проанализировать метагеном микрофлоры кишечника пациентов с диагностированным колоректальным раком и выявить сходство и различие в составе микробных сообществ, ассоциированных с нормальным и малигнизированным эпителием;
4. Охарактеризовать плазмидный профиль и генетические детерминанты, контролирующие адгезивную, гемолитическую и токсигенную активности у штаммов *E. coli*, выделенных из биоптатов нормального и трансформированного эпителия кишечника больных колоректальным раком.

Научная новизна

Получены новые данные в описании архитектуры микробного сообщества пристеночного слоя кишечника у человека и сравнительном анализе сообщества микроорганизмов, плотно ассоциированных с нормальным и трансформированным эпителием прямой кишки пациентов с диагностированным КРР. Получены новые детальные знания о таксономической принадлежности бактериальных сообществ, плотно ассоциированных с нормальным и трансформированным эпителием прямой кишки пациентов с диагностированным КРР. Впервые был сравнительно анализирован плазмидный профиль микробных сообществ, плотно ассоциированных с нормальным и трансформированным эпителием прямой кишки пациентов с диагностированным КРР. Была оценена способность микрофлоры, колонизирующей нормальный и озлокачествленный эпителий, к синтезу и секреции рибонуклеаз (РНКазы) поскольку известно, что РНКазы обладают широким спектром биологических эффектов, в том числе способны проявлять противоопухолевую активность. В работе была использована электронная парамагнитная резонансная спектроскопия для оценки степени

генерации активных форм кислорода бактериями желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Проведен молекулярный анализ генетических детерминант, контролирующих адгезивную, гемолитическую и токсигенную активности у бактерий, плотно ассоциированных с нормальным и трансформированным эпителием прямой кишки пациентов с диагностированным КРР.

Теоретическая и научно-практическая значимость работы

Полученные в рамках диссертационной работы научные данные составляют основу знаний о составе микробных сообществ кишечника и их взаимосвязи с организмом человека. Расширены научные представления о разнообразии микроорганизмов кишечника и их особенностей как продуцентов РНКаз, выявлены генетические детерминанты патогенности у бактерий с трансформированного и нормального прилежащего эпителия. Полученные результаты имеют важное прикладное значение в клинической медицине для мероприятий по профилактике постоперационных осложнений, поскольку идентифицируют плотно связанные с мукозным слоем микроорганизмы кишечника при КРР. Установлены значения активности РНКаз у бактерий зоны очага КРР и нормального прилежащего эпителия, что обосновывает теоретические возможности для разработки новых подходов к терапии КРР, в частности, использование экзогенных бактериальных РНКаз в качестве потенциальных противоопухолевых агентов.

Научно-практическая значимость работы отчасти заключается также в разработке оптимальных подходов к изучению кишечных микробных сообществ. Полученные новые данные микробиомного анализа кишечника человека при КРР дают основание предполагать, что диагностическим показателем КРР отчасти может служить только нарушение соотношения определенных групп бактерий в очаге КРР по сравнению с нормальным эпителием. Однако, такой дисбаланс не представляет собой однозначного критерия КРР в связи с широкой вариабельностью состава и соотношения групп в микрофлоре отдельных больных и здоровых людей. В то же время сравнительные данные особенности микробных сообществ, плотно ассоциированных с нормальным и трансформированным эпителием прямой кишки пациентов с диагностированным КРР могут быть использованы для целевой антибиотикотерапии.

Положения, выносимые на защиту:

1. В структуре микробных сообществ эпителия кишечника пациентов с диагностированной колоректальной карциномой выявлены различия между отдельными пациентами при общем доминировании двух фил *Firmicutes* и

Bacteroidetes; различия структур сообществ, плотно связанных с малигнезированным и прилежащим неповрежденным эпителием, исключительно количественные.

2. Культивируемые факультативно-аэробные гетеротрофные бактерии, ассоциированные с малигнезированным эпителием кишечника пациентов с колоректальным раком, не отличаются по чувствительности к триметоприму, тетрациклину, налидиксовой кислоте и пенициллину от бактерий с нормального эпителия, но различаются по чувствительности к ципрофлоксацину, гентамицину, хлорамфениколу и эритромицину.

3. Для *E. coli* с малигнезированного эпителия выявлен повышенный уровень активности внеклеточных РНКаз по сравнению с изолятами этих бактерий с нормального эпителия кишечника.

4. У *E. coli* под действием секретируемой РНКазы *Bacillus pumilus* увеличилась генерация активных форм кислорода.

5. У большинства изолятов *E. coli* с трансформированного и нормального эпителия выявлено наличие генов токсинов канцерогенного действия, колибактина и цитотоксического некротизирующего фактора 1.

Достоверность результатов проведенных исследований подтверждается значительным объемом многократных лабораторных экспериментов, выполненных и проанализированных с использованием современных высокоточных приборов, а также опубликованием полученных результатов работы в международных и отечественных журналах с рецензированием ведущими учеными в данной области.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены и обсуждены на 6-ом Конгрессе Европейских Микробиологов (The 6th Congress of European Microbiologists, FEMS, 7-11 June 2015, Maastricht, Netherlands), Всероссийской школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (КФУ, Казань, 2014), IV Международной научно-практической конференции «Новые концепции механизмов воспаления, аутоиммунного ответа и развития опухоли» (КГМУ, Казань, 2014), Всероссийской заочной научно-практической конференции с международным участием (Казань, 16 марта 2013), V Всероссийском с международным участием медико-биологический конгрессе молодых ученых "Симбиоз-Россия 2012"(Тверь, 03-08 декабря 2012) и Национальной конференции совместного развития (National Conference on Cooperatives Development, Ethiopia, May7-8, 2015).

Место выполнения работы и собственный вклад соискателя. Работа выполнена на кафедре микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета. Часть экспериментальных работ по выявлению активных форм кислорода проведена в лаборатории ЭПР Института физики КФУ. Выявление генетических детерминант патогенности бактерий, а также идентификация микроорганизмов осуществлена с использованием оборудования междисциплинарного Центра геномных и протеомных исследований НОЦ КФУ.

Автором диссертации совместно с научным консультантом сформулированы цели, задачи и основные направления исследовательской работы. Автор самостоятельно проводил анализ данных литературы, а также формулировал интерпретацию полученных результатов, текстовый материал статей и диссертации. На основании самостоятельного выполненного экспериментальной работы автор решил поставленную задачу по характеристике структуры микробных сообществ кишечника человека при колоректальном раке, которая важна для понимания роли кишечной микрофлоры в возникновении и развитии рака.

Связь работы с научными программами. Научная работа по теме диссертации выполнена в рамках Программы повышения конкурентоспособности КФУ Министерства образования и науки Российской Федерации. Работа поддержана грантом Российского научного фонда (РНФ № 14-14-00522).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, среди которых 5 публикаций в рецензируемых журналах, включенных в список ВАК. Четыре журнала входят в базу данных SCOPUS и одновременно базу данных WoS.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 118 страницах машинописного текста, содержит 18 таблицы и 21 рисунок и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследований и их обсуждения, заключения и 196-х библиографических ссылок (список литературы).

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю академику АН РТ, д.б.н., профессору ИФМиБ КФУ О.Н. Ильинской за неоценимую помощь при подготовке диссертационной работы, плодотворное обсуждении полученных результатов, за всестороннюю поддержку и внимательное отношение к работе. Автор благодарен хирургу-онкологу проф. И.Г. Гатауллину за предоставленные образцы тканей эпителия

кишечника. Автор благодарит А.М. Зиганшина, П.В. Зеленихина, Р.Р. Вафина, А.А. Макееву, А.В. Тойменцеву за поддержку и помощь в работе. Автор выражает искреннюю благодарность всем коллегам-сотрудникам кафедры микробиологии КФУ за всестороннюю помощь и доброжелательную рабочую атмосферу.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Материалы. Биоптаты слизистой толстой и прямой кишки (средний размер которых составлял 5-7 × 5-7 мм) были взяты от 33 пациентов Республиканского Онкологического Центра и городской клинической больницы №5, подвергнутых оперативному рассечению кишки в связи с диагнозом КРР. Биоптаты исследованы в соответствии с разрешением Этического комитета Казанской государственной медицинской академии (протокол № 4 от 7 мая 2009 г.), предоставленным нам на основании сотрудничества с оперирующим хирургом профессором И.Г. Гатауллиным. Объектами исследования являются микробные сообщества, плотно ассоциированные с нормальным и трансформированным эпителием прямой кишки больных КРР.

Клетки аденокарциномы кишечника человека HuTu выращивали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ на среде ДМЭМ, обогащенной 10% эмбриональной бычьей сывороткой и 2 мкМ глутамина, с добавлением 100 ед./мл пенициллина и стрептомицина.

В настоящей работе использовали биназу – гуанил-специфичную РНКазу штамма *Bacillus pumilus* 3-19, несущего плазмиду pGEMGX1/ent/Bi и полученного в лаборатории Биосинтеза и биоинженерии ферментов кафедры микробиологии КФУ по методике, описанной Шульга с соавторами [Schulga et al., 1998]. Молекулярная масса и ферментативная активность биназы в отношении различных синтетических субстратов, а также высокополиморфной РНК дрожжей, были описаны в более ранних работах [Yakovlev et al., 1994; Ilinskaya et al., 1996].

Микробиологические методы анализа. Микроорганизмы с биоптатов смывали натрий-фосфатным буфером и высевали на среды МПА, Эндо. Через 48ч. проводили учет колоний и морфологическую характеристику бактерий окрашиванием по Граму. Для определения антагонистической активности выделенных бактерий по отношению к *E.coli* K12 переносили исследуемые

культуры в виде вырезанного участка с агаром на новые чашки Петри, где заранее газом была засеяна 6-часовая бульонная культура *E. coli* K12. Результат учитывали через 24 ч инкубации при 37°C по зонам подавления роста штамма *E. coli* K12 вокруг исследуемых культур.

Молекулярно-генетические анализы. Проводили идентификацию культивируемых микроорганизмов с помощью масс-спектрометрического анализа МАЛДИ ТОФ Biotyper. Метагеномный анализ микробных сообществ биоптатов проводили секвенированием после выделения тотальной ДНК, и амплификации бактериальных генов 16S рНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Анализ полученных данных и сортировки мультиплекс-идентификаторов проводили с помощью программного обеспечения GS Junior software. Бактериальные последовательности были дополнительно обработаны и проанализированы с помощью программного пакета QIIME 1.8.0 software package (<http://qiime.org/>) в соответствии с протоколами QIIME. Для сравнения бета-разнообразия микробных сообществ в образцах использовали взвешенный (количественный) и невзвешенный (качественный) UniFrac с координатным анализом (PCoA) [Lozupone, et al., 2005, 2011; Krzanowski, 2000], реализуемым в QIIME.

Выявление генетических детерминант, контролирующих адгезивную (*papC*, *papH*, *afa*, *eae*, *bfpA*), гемолитическую (*hlyA*) и токсигенную (*lthB*, *STa*, *Stx*, *pks*, *cnfI*, *cdtB*, *cif*) активности, проводили с использованием праймеров для генодиагностики *E. coli*. Секвенированные последовательности локусов 16S *rRNA*, *pks* и *cnfI* выравнивали в соответствии с опубликованными в GenBank нуклеотидными последовательностями ряда референтных штаммов микроорганизмов, используя программы BLAST и Clustal W (v. 1.83).

Физиолого-биохимические методы. У выделенных микроорганизмов проверяли гемолитическую активность, устойчивость к ряду антибиотиков методом диффузии препарата с дисков на агаризованной среде Мюллера-Хинтона; оценивали внутриклеточную и секретируемую РНКазную активность по образованию кислоторастворимых продуктов гидролиза из высокополимерной дрожжевой РНК. Для выделения плазмид использовали набор Gen JET Plasmid miniprep Kit кат. №: K0503 (Fermentas) согласно инструкции производителя. Цитотоксичность культуральной жидкости бактерий по отношению к опухолевым клеткам кишечника HuTu исследовали на проточном цитофлуориметре FACSCanto2 (BD, США).

Электронная парамагнитная резонансная спектроскопия (ЭПР). Методом ЭПР характеризовали степень генерации активных форм кислорода

бактериями ЖКТ (*E. coli*) под действием РНКазы - биназы с использованием зонда TMT-Н. Эксперименты проводили в X-диапазоне на стационарном спектрометре ESP-300 фирмы Bruker.

Математическая обработка результатов. Статистический анализ проводили с использованием стандартных методов математической статистики в программе Microsoft Excel 2007. Эксперименты проводили в трехкратной повторности. Критерий вероятности $p < 0.05$ принимали достаточным для достоверной разницы групп данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Структура бактериального сообщества эпителия прямой кишки пациентов с колоректальным раком

Анализ биоптатов позволяет отражать содержание пристеночной, криптовой микрофлоры кишечника, которые на наш взгляд более стабильны у индивидуального организма по сравнению с внутрипросветной (полостной) микрофлорой. Микробные сообщества биоптатов нормального и малигнизированного эпителия кишечника пациентов с КРР были исследованы по методу пиросеквенирования фрагментов генов 16S рРНК.

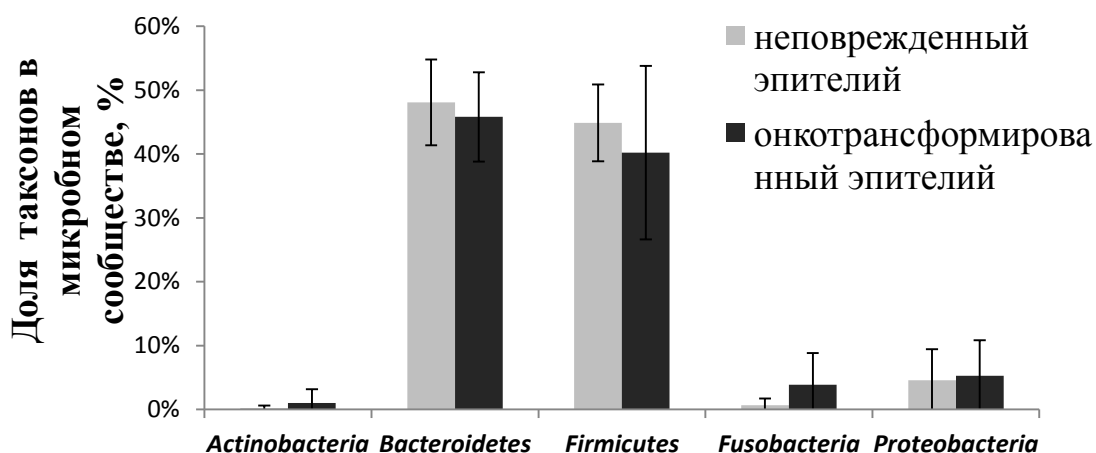


Рисунок 1 – Сравнительное содержание отдельных групп бактерий, ассоциированных с неповрежденным и трансформированным эпителием прямой кишки. За 100% принято общее количество бактерий, выделенных с каждого типа эпителия.

Установлено, что у больных КРР преобладают филы *Firmicutes* и *Bacteroidetes*, а содержание филы *Actinobacteria* низкое. Важно отметить, что наблюдалась тенденция к повышению содержания *Fusobacteria* в области онкотрансформированного эпителия (рис. 1).

Относительное распространение групп бактерий с процентом встречаемости более 0,5% продемонстрировано на рисунке 2.

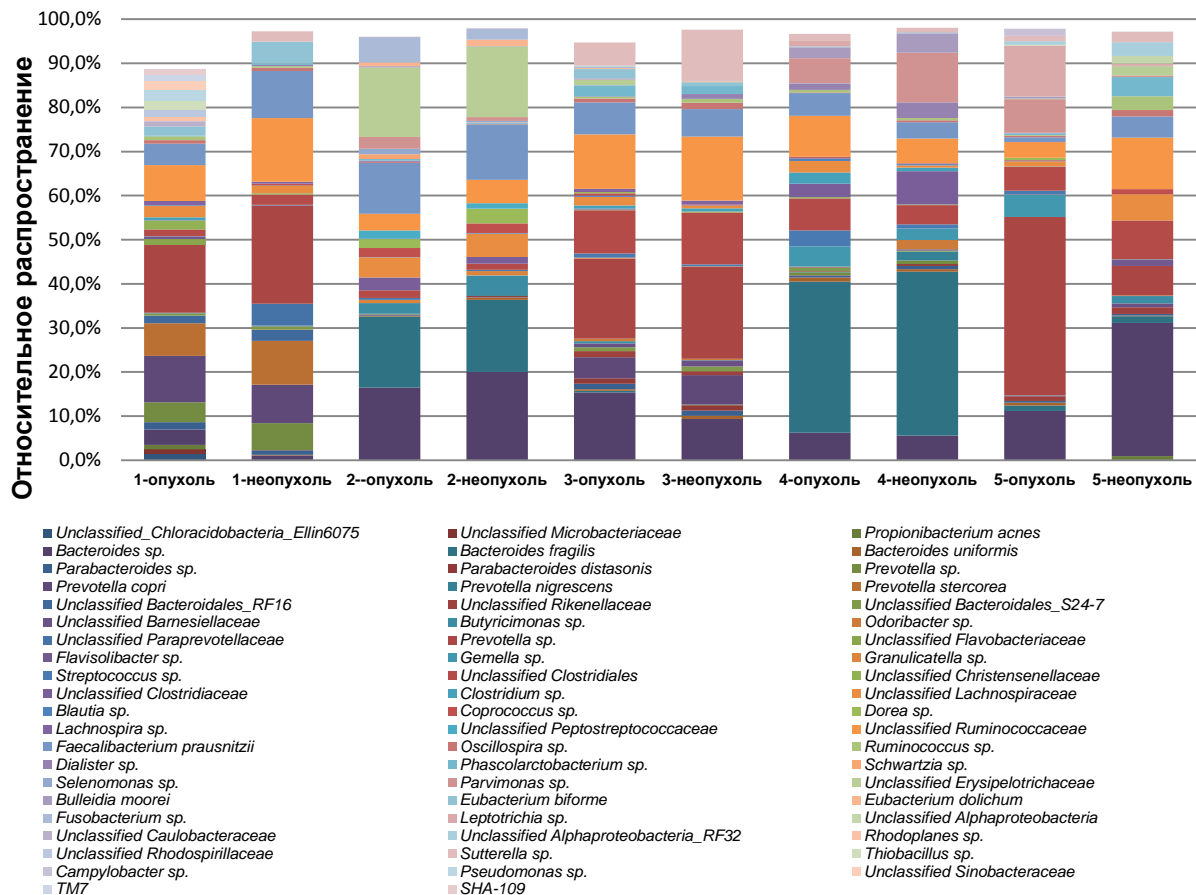


Рисунок 2 – Структура микробного сообщества эпителия прямой кишки 5 пациентов с колоректальным раком

Из рисунка 2 видно, что в пределах одного индивидуума - пациента в микробных сообществах опухолевой и условно здоровой ткани (как количественное, так и качественное) особых различий не наблюдали. Однако, по результатам филогенетического анализа UniFrac, который измеряет различия между сообществами на основе содержащихся в них клонов [Lozupone et al., 2007; DeLong, 2013], зафиксированы и исключения: в микробных сообществах опухоли (биоптат №10) и условно здоровой ткани (биоптат № 9) от одного и того же пациента было зафиксировано значительное различие (рис. 3). Выявлены различия между отдельными пациентами; различия структур сообществ, плотно связанных с малигнизировавшимся и прилежащим неповрежденным эпителием, исключительно количественные. В микробном сообществе, выделенном с малигнизированного эпителия, повышено содержание фил *Proteobacteria* и *Fusobacteria*. Особенно повышен уровень представителей родов *Leptotrichia* sp. (на 11,1%), *Fusobacterium* sp. (на 3,3 %), *Gemella* sp. (на 4,9%). Понижено содержание фил *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. Максимально понижено содержание *Bacteroides* sp. (на 19,1%), *Ruminococcaceae* (на 8,1%),

Sutterella sp. (на 6,4%) по сравнению с этими бактериями, выделенными с нормальной эпителиальной ткани. Существует много доказательств, подтверждающих, что род *Leptotrichia* представляет собой группу бактерий, приобретающих новые патогенные свойства и связанных с широким спектром инфекций у человека. По нашим данным, наблюдается сочетанное повышение *Leptotrichia sp.* и *Fusobacterium sp.*, что согласуется с результатами работы Warren с соавторами [Warren et al., 2013]

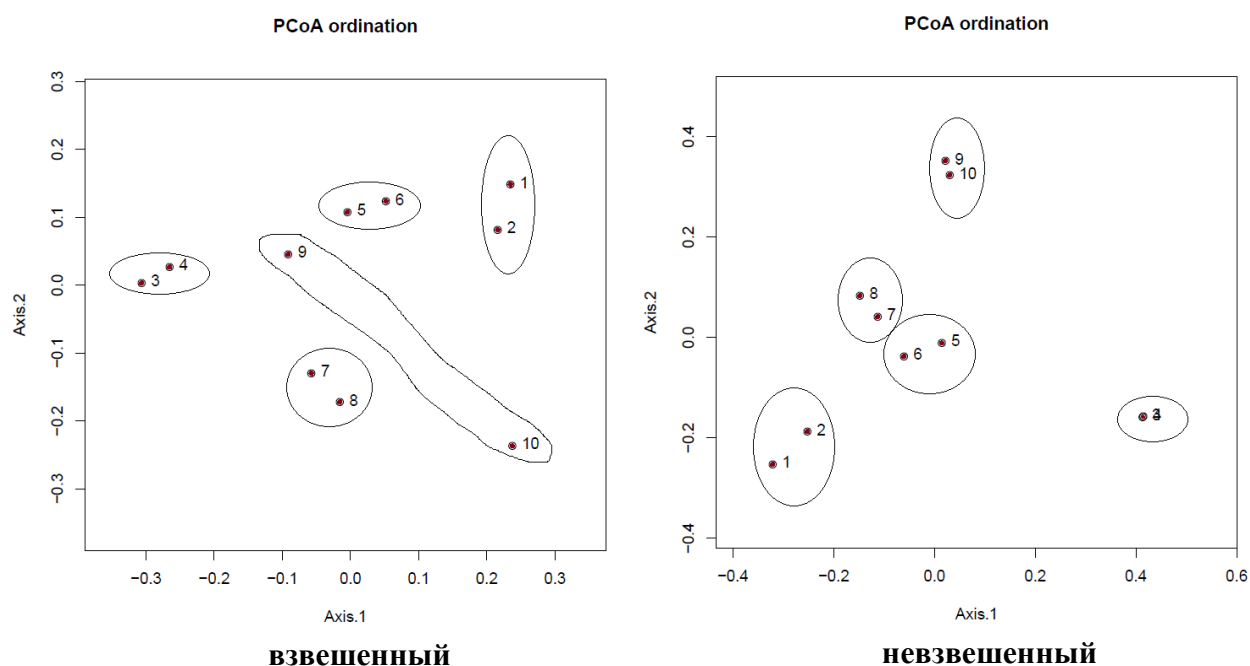


Рисунок 3 - PCoA- диаграмма микробного сообщества, характерна для опухолевой и неопухолевой эпителиальной ткани попарно от 5-и пациентов (окружности соответствуют одному пациенту). Представлены образцы опухолевого эпителия (1,3,5,7,10) и условно-здоровой ткани (2,4,6,8,9). Расстояние между точками одной окружности тем больше, чем больше различий в микробиомах эпителия опухоли и нормальной ткани от одного пациента.

Harold и его коллеги [Harold et al., 2012] предложили модель «водитель – пассажир» для колоректального рака, то есть КРР может быть инициирован бактериями «водителями», которые, в конечном счете, увлекают за собой в определенные ниши бактерии «пассажиры», способствуя развитию рака, либо затормаживая процесс канцерогенеза. Бактериальные «водители» и «пассажиры» имеют различные временные роли в патогенезе [Harold et al., 2012]. Количественные различия структур сообществ могут быть объяснены с привлечением этой гипотезы. Выявлен ряд патогенных бактерий, а именно энтеротоксигенные представители вида *B. fragilis*, родов *Fusobacterium*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, и пр. Эти патогены отчасти могут быть представителями вышеупомянутых «водителей», конкурируя с комменсальными

бактериями и влияя на прогрессию КРР. Кроме того, считают, что у здоровых людей практически отсутствуют патогенные бактерии в кишечнике [Tyakht et al., 2013; Старостина и др., 2012]. Согласно нашим результатам, именно эти бактерии выявлены у пациентов с КРР, причем наблюдается особое обогащение родом *Fusobacterium* в тканях опухоли.

2. Культивируемые бактерии, выделенные из образцов биоптатов пациентов с колоректальным раком

Из биоптатов нормального и онкотрансформированного эпителия прямого кишечника, полученных от 28 пациентов, было выделено 116 изолятов бактерий по морфологическим признакам колоний. В среднем на 1 мл суспензии, полученной при промывке биоптата натрий-фосфатным буфером (PBS, Sigma, США), высевалось от 10^3 до 10^5 микроорганизмов. Таким образом, количественные показатели присущей эпителию кишечника микрофлоры невысоки, что связано с предоперационным очищением кишечника пациентов, а также с тем, что большинство пациентов до операции подвергались лучевой терапии. Нами не выявлено достоверного различия в общем количестве культивируемых бактерий между образцами трансформированного и нормального эпителия. Однако значительное различие наблюдалось индивидуально при каждом пациенте. Идентифицированы все культивируемые изоляты в соответствии со спектром индивидуальных белков согласно масс-спектрометрическому анализу на BioTyper 2.0. MALDI-TOF. Анализ полученных нами данных показал, что биоптаты больных КРР заселены плотно ассоциированными с эпителием условно-патогенными гетеротрофными факультативно аэробными бактериями. Культивируемая микрофлора биоптатов представлена на рисунке 4.

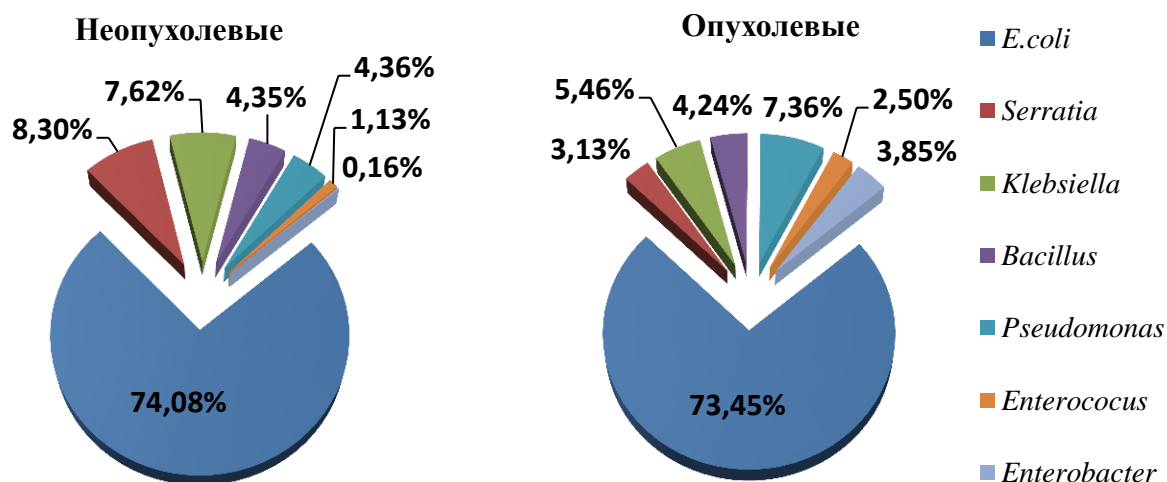


Рисунок 4 – Доля культивируемых бактерий, выделенных из биоптатов условно-нормального и онкотрансформированного эпителия прямой кишки, %

Наиболее часто встречающимся культивируемым штаммам являются *E. coli*. Полный анализ микрофлоры 10 биоптатов, проведенный по 16S РНК, отображен на рисунке 2. При этом выявлен ряд бактерий, которые являются плохо культивируемыми на стандартной среде, а также несколько неидентифицированных микроорганизмов.

3. Антагонистическая активность выделенных бактерий по отношению к *E.coli* K12

Из проверенных 32-х штаммов *E. coli*, выделенных из больных КРР, антагонистическую активность по отношению к *E.coli* K12 обнаружили только у одного штамма (3,125%), вероятно, именно этот штамм может быть колициногенным [Ozeki et al., 1959; Papadakos et al., 2012].

4. Гемолитическая активность изолированных бактерий

Большинство видов бактерий продуцирует токсичные продукты, способные разрушать эритроциты. После инкубации в течение ночи, 80% изолятов бактерий, выбранных случайным образом из ракового эпителия, продемонстрировали либо β -, либо α - гемолитическую активность. 62.5% бактерий, обладающих гемолитической активностью, относятся к *E. coli*.

5. *In vitro* чувствительность выделенных бактерий к антибиотикам

Антибиотикоустойчивость 10 изолятов, выбранных случайным образом, тестировали на агаризованных чашках со средой Мюллера – Хинтона. В работе мы использовали 8 антибиотиков – хлорамфеникол (C), триметоприм/сульфаметоксазол (SXT), тетрациклин (TE), ципрофлоксацин (CIP), эритромицин (E), налидиксовую кислоту (NA), гентамицин (CN) и пенициллин G (P). Результаты представлены на рисунке 5.

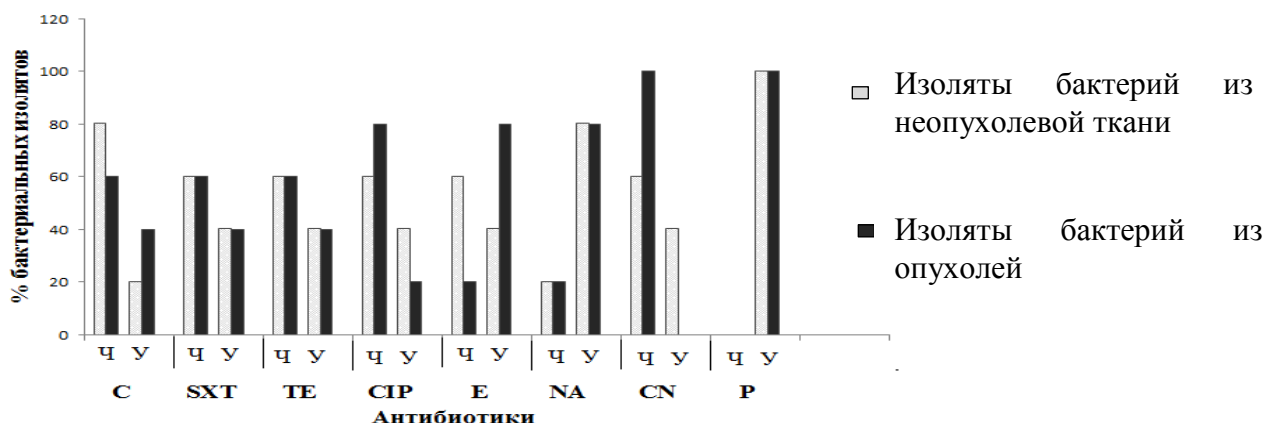


Рисунок 5 – *In vitro* чувствительность к антибиотикам 10 изолятов бактерий, выделенных из кишечника больных колоректальным раком. Ч=чувствительный; У=устойчивый

Тестируемые изоляты оказались чувствительными к трем антибиотикам – гентамицину (80%), ципрофлоксацину (70%) и хлорамфениколу (70%). Бактерии, ассоциированные с малигнизировавшимся эпителием, не отличаются по чувствительности к триметоприму, тетрациклину, налидиксовой кислоте и пенициллину от бактерий с нормального эпителия, но различаются по чувствительности к ципрофлоксацину, гентамицину, хлорамфениколу и эритромицину. Все использованные антибиотики сгруппированы по 4 категориям на основе механизма действия – ингибиторы синтеза белка (хлорамфеникол, тетрациклин, эритромицин, гентамицин), ДНК (налидиксовая кислота, ципрофлоксацин), фолиевой кислоты (триметоприм/сульфаметоксазол) и клеточной стенки (пенициллин). Был проведен статистический анализ устойчивости *E. coli* (70% от всех случайно выбранных изолятов) (рис. 6).

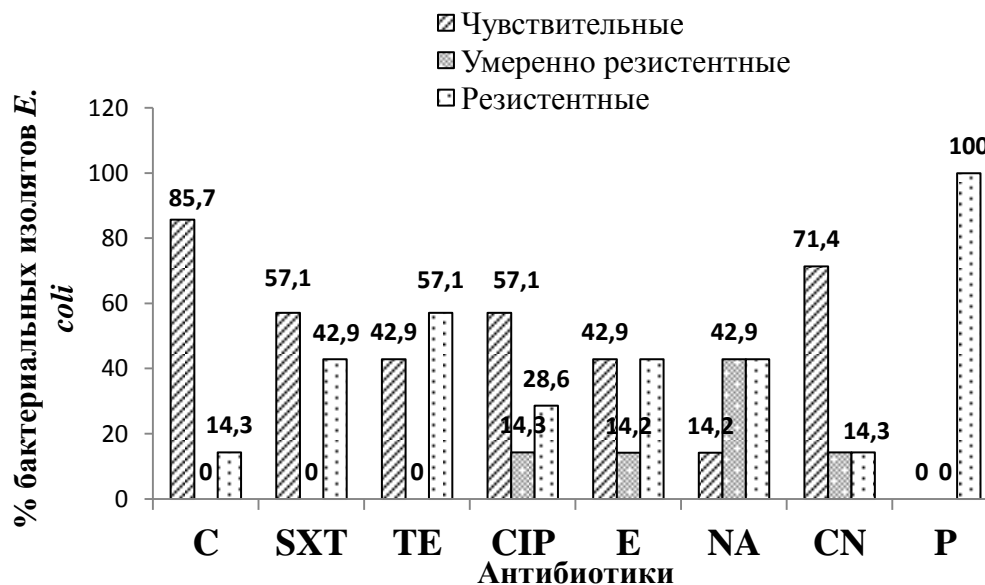


Рисунок 6 – Устойчивость к антибиотикам *E. coli*, выделенных из кишечника больных колоректальным раком

В первой группе обнаружены штаммы *E. coli*, чувствительные (более 60%) к антирибосомальным антибиотикам. В состав второй группы входили штаммы, умеренно чувствительные к ингибиторам синтеза нуклеиновых кислот – ципрофлоксацину и налидиксовой кислоте (35%). Третья группа содержала штаммы *E. coli*, устойчивые к ингибитору синтеза клеточной стенки пенициллину G (100%). Такие антибиотики, как ципрофлоксацин и метронидазол играют важную роль в лечении воспалительных заболеваний кишечника, которые способны привести к развитию колоректального рака. Согласно [Gomi et al., 2001], энтеропатогенные бактерии более чувствительны к ципрофлоксацину, в то время как традиционные противомикробные средства,

такие как ампициллин, триметоприм и триметоприм/сульфаметоксазол, не столь эффективны. Нами получены сходные результаты: более 40% изолятов, выделенных из опухолей обладают полирезистентностью к антибиотикам. Все выбранные изоляты бактерий устойчивы к пенициллину G.

6. Рибонуклеазная активность бактерий

6.1. Рибонуклеазная активность выделенных бактерий на бесфосфорной среде

Мы показали, что более высокая активность внеклеточных РНКаз (таблица 1) характерна для микрофлоры опухолевого эпителия.

Таблица 1 – Доля изолятов бактерий из биоптатов онкотрансформированного и нормального эпителия прямого кишечника, обладающих рибонуклеазной активностью.

	Доля бактерий с секретируемыми РНКазами, % от общего числа изолятов определенной грампринадлежности			
Время культивирования бактерий на синтетической бесфосфорной среде, ч	8		24	
Грампринадлежность	Положительные	Отрицательные	Положительные	Отрицательные
Тип эпителия				
Условно здоровый	50	24	75	93
Малигнизированный	100	81.6	100	100

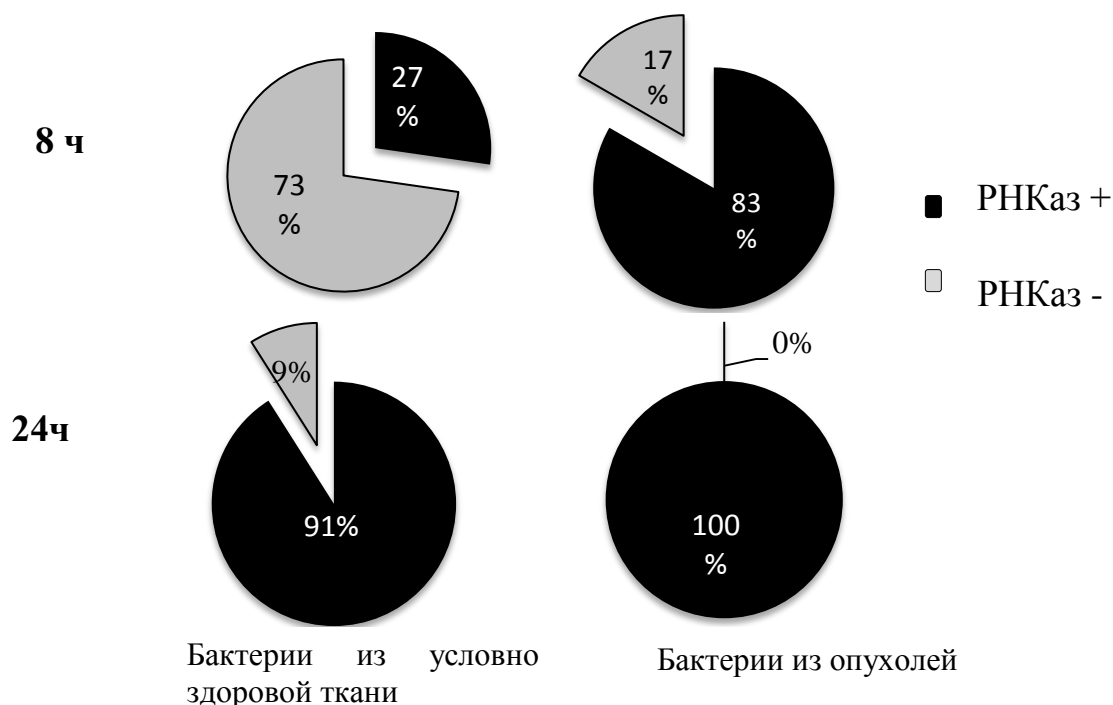


Рисунок 7 – Доля бактериальных изолятов, обладающих секретируемой РНКазной активностью при роста на бесфосфорной среде в течение 8 и 24ч.

После 8 часов культивирования, на обогащенной РНК синтетической среде с дефицитом фосфора 83% изолятов онкотрансформированного эпителия и 27% изолятов условно здорового эпителия обладали значительной внеклеточной рибонуклеазной активностью. 91% бактериальных изолятов здоровых эпителиальных тканей продемонстрировали одинаковый невысокий уровень активности после 24 часов культивирования. 9% изолятов здорового эпителия не проявили какой-либо видимой внеклеточной РНКазной активности (рис. 7). Особо нужно отметить, что отдельные виды бактерий имеют разный уровень секретируемых РНКаз (рис. 8). При этом основной вклад в высокий уровень активности РНКаз бактерий с малигнезированного эпителия вносят виды *Bacillus*, и, прежде всего, *E.coli*. Аналогичная картина показана для *Klebsiella*, однако, в целом активность ее РНКаз очень низкая, что позволяет исключить ее из бактерий, вносящих вклад в общий уровень секретируемых РНКаз. Эта тенденция выглядит закономерной, поскольку именно кишечная палочка доминирует в составе микробного сообщества гетеротрофов кишечного эпителия (рис. 4).

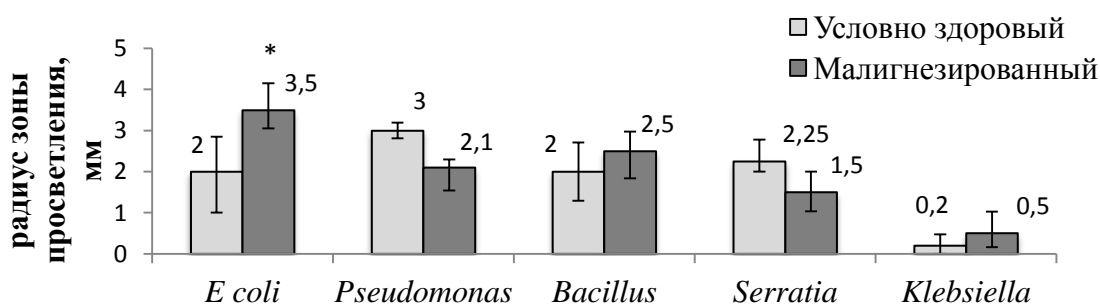


Рисунок 8 – РНКазная активность бактерий, выделенных из биоптатов онкотрансформированного и нормального эпителия прямого кишечника (после 24 ч культивирования).

Внутриклеточную РНКазную активность оценивали для всех штаммов. Было также обнаружено, что более высокий уровень активности наблюдался у изолятов, выделенных из опухолевого эпителия.

Различия в рибонуклеазной активности бактерий, населяющих кишечник, могут отражать характер сайтов колонизации стенки толстого кишечника. Активация синтеза внеклеточных РНКаз у групп бактерий, колонизирующих поврежденные участки ткани кишечника, можно оценивать как возможный контролирующий механизм нормальной флоры при колоректальном опухолеобразовании и защиты его естественного местообитания. Несомненно, адаптационная модель [Yu et al., 2015], оперирующая с изменением микроокружения опухоли под действием бактерий, не может быть исключена из рассмотрения при общем анализе механизмов возникновения и развития

КРР. В частности, примером такого изменения микроокружения в нашей работе был повышенный уровень секретируемых РНКаз у *E.coli* на малигнезированном эпителии (рис. 8). Этот факт свидетельствует о малоизученных адаптационных механизмах, позволяющих микрофлоре противостоять онкологическим заболеваниям.

Разница в РНКазной активности бактерий, ассоциированных с пораженным раком или прилежащим местом в прямой кишке, возможно связана с экспрессией РНК клетками хозяина. Известно, что РНК в наноразмерных мембранных везикулах - экзосомах секретируются многими типами клеток [Raposo et al., 2013]. В экзосомах были обнаружены различные виды РНК, включая микроРНК, матричные РНК и длинные некодирующие РНК. У пациентов с КРР показано повышенное количество циркулирующих в плазме экзосом по сравнению с нормальными здоровыми людьми [Silva et al., 2012], следовательно, можно предполагать повышенное содержание экзогенной РНК в поврежденной слизистой кишечника. В зависимости от клеточного окружения, конкретные микроРНК могут действовать либо как опухолевые супрессоры или онкогены [Schetter et al., 2012]. Установлено различие в уровне экспрессии РНК между опухолевой и нормальной тканью. Определенные онкогенные микроРНК могут быть потенциальными диагностическими и прогностическими биомаркерами, а также терапевтической мишенью при КРР. [Luo et al., 2011; Schetter et al., 2012; Vega et al., 2013]. Различные паттерны экспрессии длинных некодирующих белок РНК также вовлечены в развитие КРР [Xue et al., 2015; Chen et al., 2014]. Если некодирующие РНК являются потенциальными мишенями при КРР, то современные представления о роли и функциях РНКаз в клетках позволяют рассматривать эти ферменты как перспективную альтернативу традиционным химиотерапевтическим средствам в щадящей терапии злокачественных новообразований.

6.2. Рибонуклеазная активность культуральной жидкости *E. coli*

Хотя бактерии *E. coli* обладают РНКазой, которая плохо секретируется и расположена в основном периплазме [Neu and Heppel, 1964], мы сравнили динамику роста бактерии и активность РНКаз в культуральной жидкости у штаммов, выделенных с нормального и трансформированного эпителия кишечника. Кривые роста двух штаммов практически идентичны, однако, в активности РНКаз наблюдается тенденция превышения уровня их активности у штамма с трансформированного эпителия. Полученные данные еще раз

свидетельствуют о возможном вкладе внеклеточных РНКаз, обладающих противоопухолевой активностью, в борьбу организма с раком.

7. Генерация активных форм кислорода клетками *E. coli* K12 под действием РНКазы - биназы.

Присутствующие в среде обитания РНКазы может оказывать действие на клетки бактерии. Нами было выявлено изменение функционального состояния *E. coli* K12 под действием рибонуклеазы *Bacillus pumilis* 3-19 в концентрациях, не обладающих токсическим и ростостимулирующим действием по отношению к бактериям, с помощью метода ЭПР.

Одну из важнейших ролей в клетке играют активные формы кислорода (АФК). Избыточное образование АФК может провоцировать оксидативные повреждения витальных биомолекул, таких как ДНК, белков и липидов, а в клетках прокариот АФК способны повреждать, в том числе и железо-серные белки [Somerville et al., 2009]. Интенсивность спектров спинового аддукта при добавлении к прокариотическим клеткам биназы значительно выше, чем в контроле (рис. 9), что свидетельствует об усилении генерации АФК. Таким образом, фермент способен провоцировать окислительный стресс у *E. coli* K12.

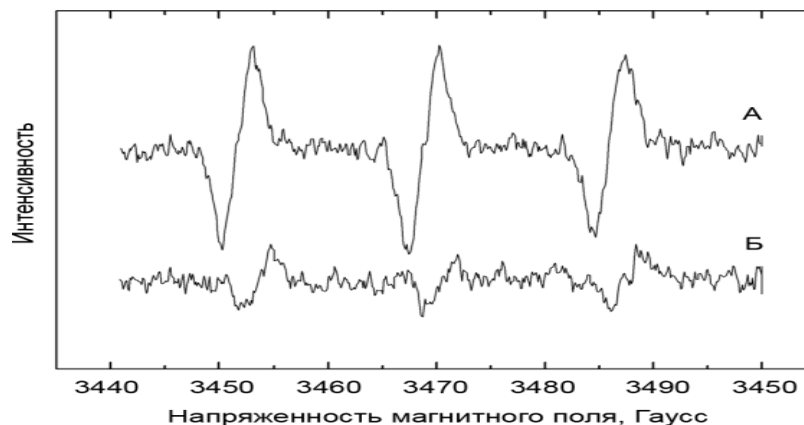


Рисунок 9 – Спектры ЭПР-аддуктов спиновой ловушки ТМТН при обработке клеток *E. coli* K12 биназой (300 мкг/мл, А) и в варианте без обработки ферментом (Б).

8. Цитотоксичность стерильной культуральной жидкости выделенных *E. coli* после 16 ч культивирования

Добавление культуральной жидкости (КЖ) выделенных *E. coli* вызывает гибели клеток карциномы кишечника HuTu за 48ч. (до 10%, такова как в случае с КЖ *Bacillus pumilis* - бактерия, выделяющая биназу) (рис. 10). В случае с КЖ *E. coli* K12, доля мертвых клеток карциномы кишечника HuTu высокая (35%). Однако РНКазная активность *E. coli* K12 была больше РНКазной активности *E. coli*, выделенных из биоптатов кишечника больных. Известно, что *E. coli* K12 не

токсигена, следовательно, есть вероятность того, что цитотоксическое действие ее КЖ по отношению к клеткам карциномы кишечника HuTu может быть в РНКазной активности, АФК. Токсигенными факторами бактерий эпителия кишечника могут быть РНКазы, АФК или токсины.

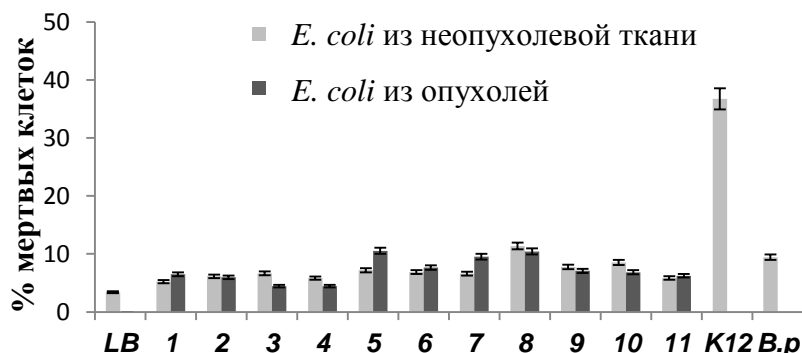


Рисунок 10— Индукция гибели клеток карциномы кишечника HuTu за 48ч. культуральной жидкостью бактерий (16 ч. роста). (K12: *E. coli* K12; B.p: *Bacillus pumilus*)

9. Молекулярный анализ генетических детерминант, контролирующих адгезивную, гемолитическую и токсигенную активности у *E. coli*

Мы провели секвенирование локуса *16S rRNA* 6 случайно выбранных выделенных штаммов *E. coli* (Tru26o, Tru26n, Shi1o, Shi1n, Ef15o, Ef15n) на предмет утверждающей видовой идентификации. Была подтверждена их принадлежность сугубо к *E. coli*, за исключением образцов Tru26o и Ef15n, представлявших собой смешанную культуру микроорганизмов *E. coli* и *Klebsiella pneumoniae*.

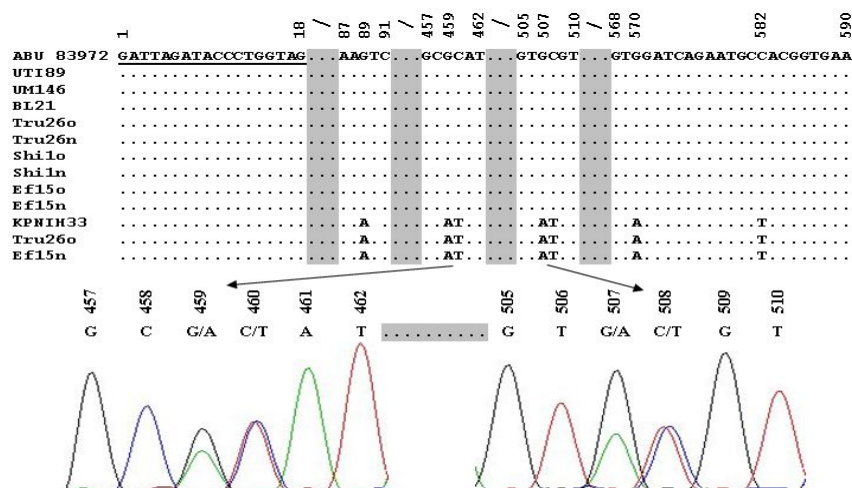


Рисунок 11 – SNP-позиции в анализируемых локусах *16S rRNA* *E. coli* и *Klebsiella pneumoniae*

Информация, обосновывающая данное утверждение, представлена на рисунке 11, с указанием идентификационных SNP-позиций в анализируемых локусах *16S rRNA* исследуемых микробных культур и референтных штаммов

E. coli (ABU 83972, UT189, UM146, BL21) и *Klebsiella pneumonia* (KPN1H33). Числовые значения SNP-позиций в анализируемых локусах *16S rRNA* были заданы последовательностью праймера ITS-F: 5'-GATTAGATACCCTGGTAG-3' (позиции 1-18), также использованной в качестве сиквенсного олигонуклеотида.

Образцы Tru26o, Shilo, Shiln давали положительный сигнал амплификации по локусу *pks*-гена (колибактин), подтвержденный секвенированием специфичного ПЦР-продукта длиной 2119 bp (рис. 12). Образец смешанной культуры Ef15n также первоначально генерировал специфичный ампликон локуса *pks*-гена. Но в процессе исследований он был заменен на перевыделенную из нее чистую культуру *E. coli* (Ef15n+), чья ДНК уже не приводила к амплификации данного ПЦР-продукта (рис. 12, трек 6). В результате выравнивания соответствующих секвенированных последовательностей ДНК установлено, что образцы Shilo и Shiln имели идентичную друг с другом структуру анализируемого локуса *pks*-гена, но отличную всего в 1 синонимическую нуклеотидную замену (SNP-позиция 1041) с референтными штаммами *E. coli* ABU 83972, UT189 и UM146 (рис. 13).

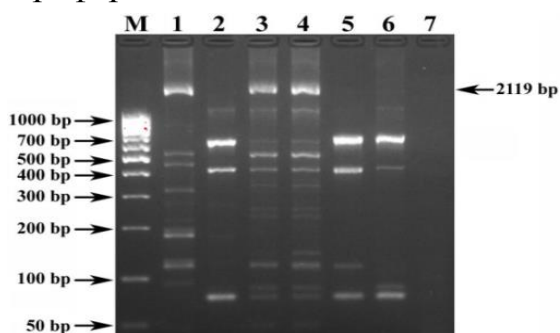


Рисунок 12 - Электрофореграмма результата ПЦР с праймерами *pks*-f + *pks*-r (амплификация локуса *pks*-гена *E. coli* и *Klebsiella pneumonia*)
Обозначения: 1) Tru26o; 2) Tru26n; 3) Shilo; 4) Shiln; 5) Ef15o; 6) Ef15n; 7) ОКО.

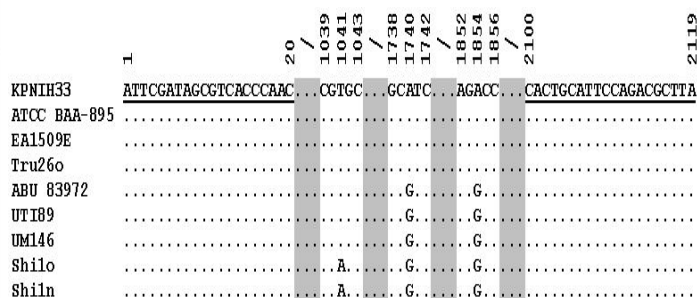


Рисунок 13 - SNP-позиции в анализируемых локусах *pks*-гена *E. coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Citrobacter koseri* и *Enterobacter aerogenes*

А нуклеотидная последовательность локуса *pks*-гена образца смешанной культуры Tru26o была схожа с соответствующими последовательностями референтных штаммов видов *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter koseri* и *Enterobacter aerogenes*, для которых также характерно наличие *pks*-гена (рис. 13). Выделенный же из этой смешанной культуры изолят *E. coli* (Tru26o+), подобно Ef15n+, не обладал способностью продуцировать колибактин.

Образцы Shi1o и Shi1n имели положительный сигнал амплификации по локусу *cnf1*-гена (цитотоксический некротизирующий фактор 1), что было подтверждено секвенированием специфичного ПЦР-продукта длиной 1112 bp (рис. 14).

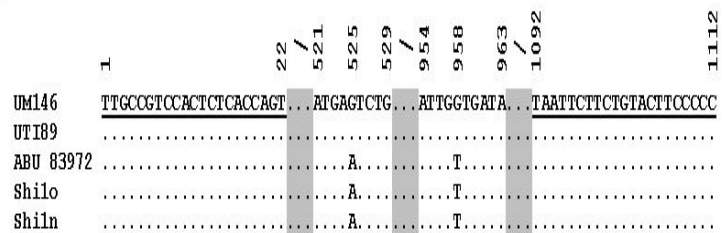
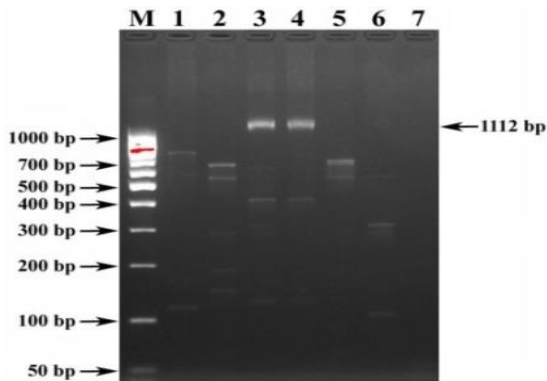


Рисунок 14 – Электрофореграмма результата ПЦР с праймерами CNF-1s+CNF-1as (амплификация локуса *cnf1*-гена *E. coli*)
Обозначения: 1) Tru26o; 2) Tru26n; 3) Shi1o; 4) Shi1n; 5) Ef15o; 6) Ef15n; 7) OKO.

Рисунок 15 - SNP-позиции в анализируемых локусах *cnf1*-гена *E. coli*

Данные образцы (Shi1o и Shi1n) имели идентичную друг с другом, а также с референтным штаммом *E. coli* ABU 83972 структуру анализируемого локуса *cnf1*-гена, установленную в результате выравнивания соответствующих секвенированных последовательностей ДНК (рис. 15).

Сводный результат проведенных молекулярно-генетических исследований представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Сводный результат молекулярно-генетических исследований образцов микробных культур, выделенных от больных колоректальным раком

№ п.п.	Образец	Анализируемые локусы генов														
		<i>16S rRNA</i>	<i>papC</i>	<i>papH</i>	<i>afa</i>	<i>eae</i>	<i>bfpA</i>	<i>hlyA</i>	<i>lthB</i>	<i>STa</i>	<i>Stx</i>	<i>cnfI</i>	<i>pks</i>	<i>cdtB I</i>	<i>cdtB IV</i>	<i>cif</i>
01	Tru26o	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
02	Tru26n	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
03	Shi1o	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
04	Shi1n	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
05	Ef15o	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
06	Ef15n	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Обозначение: «+» – наличие анализируемого локуса гена; «-» – его отсутствие.

По результатам ПЦР-анализа не выявлено в исследованных образцах микробных культур носителей хоть одного из перечисляемых локусов генов: *papC*, *papH*, *eae*, *bfpA*, *hlyA*, *lthB*, *STa*, *Stx*, *cdtBIV* и *cif*. Отсутствие же сигнала

амплификации по ряду анализированных локусов исключило наличие в исследуемых образцах микробных культур представителей энтеропатогенной (EPEC), энтеротоксигенной (ETEC), энтерогеоморрагической (EHEC), шигатоксигенной (STEC) и уропатогенной (UPEC) подгрупп *E. coli*.

Молекулярным анализом выделенных микробных культур установлено присутствие в слизистой прямой кишки больных КРР изолятов-продуцентов токсинов канцерогенного действия, несущие островок поликетидных синтаз *pks*-генов, кодирующих колибактин, и *cnf1*-генов, кодирующих цитотоксический некротизирующий фактор 1 (табл. 2), являющихся патогенетическими онкомаркерами. Появление новых данных о более высоком патогенном, персистентном и токсигенном потенциале ассоциаций условно-патогенных бактерий по сравнению с монокультурами определенно внесет существенный вклад в понимание механизмов канцерогенеза.

10. Выделение и характеристика плазмидной ДНК *E. coli*

Обнаружили, различие в наборах плазмид штаммов *E. coli*, колонизирующих нормальный и онкотрансформированный эпителий. 63% штаммов, выделенных из одного пациента, но с различных участков кишки (нормальный и злокачественный эпителий) различались по плазмидному составу. При этом не обнаруживается какой-либо характерной маркерной плазмиды, сопутствующей *E. coli*, колонизирующей только нормальный либо только малигнизированный эпителий. По данным литературы известно, что размер плазмид должен составлять не менее 2000 п.н. [Casali, Preston, 2003]. Встречающиеся на электрофореграммах фрагменты ДНК с размером меньше 2000 п.н., вероятно являются инсерционными последовательностями, которые у *E. coli* могут иметь различный размер: 768 п.н. (IS 1), 1327 п.н. (IS 2), 1258 п.н. (IS 3), 1195 п.н. (IS 5), 1329 п.н. (IS 10), 1531 п.н. (IS 50) [Starlinger, Saedler, 1972]. Данные фрагменты не являются частями более крупных плазмид поскольку методика выделения предохраняет плазмидный материал от рестрикции [GeneJET Plasmid Miniprep Kit].

Распределение размера и количества плазмид и предполагаемых мобильных генетических элементов изолятов *E. coli*, выделенных из нормального и малигнизированного эпителия кишечника по частоте встречаемости представлено в таблице 3 и на рисунке 16, соответственно.

Таблица 3 – Распределение размера плазмид и мобильных генетических элементов изолятов *E. coli*, выделенных из нормального и малигнизированного эпителия кишечника по частоте встречаемости.

Диапазон размеров плазмид и мобильных генетических элементов	Частота встречаемости	
	Нормальный эпителий	Малигнизированный эпителий
>20000 п.н.	37%	25%
2000-20000 п.н.	93%	93%
<2000 п.н.	6%	0%

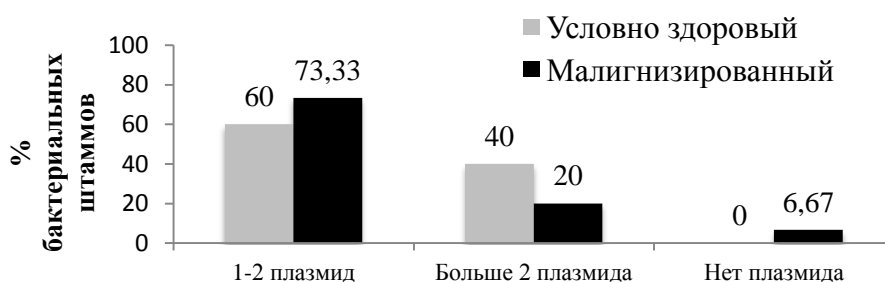


Рисунок 16 – Распределение количества плазмид и мобильных генетических элементов изолятов *E. coli*, выделенных из нормального и малигнизированного эпителия кишечника по частоте встречаемости

Для изолятов, выделенных из нормального эпителия, частота встречаемости крупных плазмид с размером более 20000 п.н., способных нести гены факторов патогенности и токсигенности [Pérès et al., 1997], а также колицинов [Smarda, Smajs, 1998], составила 37%, в то время как данный показатель для изолятов из малигнизированного эпителия не превышал 25%. Частота встречаемости плазмид, выделенных с нормального и малигнизированного эпителия с размером от 2000 п.н. до 20000 п.н., составила 93%. Предполагаемые мобильные генетические элементы с размером меньше 2000 п.н., выделенных из изолятов с непораженного эпителия кишечника, встречались с частотой, равной 6% и не встречались у изолятов, выделенных из озлокачествленного эпителия. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что наблюдается разница в профиле плазмид изолятов с нормального и малигнизированного эпителия.

ПЦР-анализ образцов плазмидной ДНК исследуемых образцов *E. coli* на *lthB*- и *STa*-гены, кодирующие термолабильный и термостабильный энтеротоксины, не выявил их наличие, что исключает принадлежность к представителю энтеротоксигенной (ЕТЕС) подгруппы *E. coli*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках настоящего исследования охарактеризована структура микробных сообществ, тесно ассоциированных с эпителиальной тканью кишечника пациентов РТ с диагностированным колоректальным раком: Установлено, что у больных КРР преобладают филы *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. Установлено отсутствие качественных различий структуры сообществ нормального и малигнезированного эпителия.

Показано, что количественно трансформированный эпителий характеризуется повышенной долей бактерий *Gemella sp.* (4,3%), *Fusobacterium sp.* (3,3%) *Leptotrichia sp.* (11,1%) и пониженным содержанием *Bacteroides sp.* (19,1%), *Ruminococcaceae* (8,1%), *Sutterella sp.* (6,4%).

Охарактеризованы физиологические особенности культивируемых факультативно-аэробных гетеротрофных микроорганизмов, ассоциированных с эпителиальной тканью кишечника пациентов с колоректальным раком: установлен более высокий уровень активности РНКаз у *E. coli* с малигнезированного эпителия, отсутствие различий в гемолитической активности. У бактерий с малигнезированного эпителия выявлена повышенная чувствительность к ципрофлоксацину и гентамицину, у бактерий с нормального эпителия – к хлорамфениколу и эритромицину.

Из 15 генетических детерминант, контролирующие адгезивную, гемолитическую и токсигенную активности, у 2-х из 6-и изолятов *E. coli* и у 1 из 2-х *Klebsiella pneumoniae* выявлено наличие генов токсинов канцерогенного действия, колибактина и цитотоксического некротизирующего фактора 1. Оба патогенетических онкомаркера присутствуют в изолятах, выделенных как с нормального так и малигнезированного эпителия.

Анализ плазмидного профиля бактерий *E. coli*, выделенных из биоптатов нормального и опухолевого эпителия, выявил незначительные различия.

Показано наличие внеклеточных РНКаз у представителей кишечной группы бактерий, в связи с чем последние могут участвовать в элиминации опухолевых клеток за счет продукции этих ферментов, генерации активных форм кислорода и факторов токсигенности – цитотоксического некротизирующего фактора и колибактина.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи списка ВАК и Scopus, WOS

1. **Нгуен Т.Н.**, Зеленихин П.В., Гатауллин И.Г., Ильинская О.Н. Рибонуклеолитическая активность бактериальной микрофлоры нормального и малигнизированного эпителия прямой кишки // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. - 2013. - Т. 155, кн. 3. - С. 60-67. http://old.kpfu.ru/uz_r/bin_files1/155_3_est_6.pdf (перечень ВАК), автора – 0.125 пл.
2. Zelenikhin P.V., **Nguyen N.**, Ilinskaya O.N. et al. Effect of *Bacillus pumilus* ribonuclease on the paramagnetic centers of microbial cells // Microbiology. – 2013. – V. 82, № 6 – P. 862 – 867. ISSN: 0026-2617 <http://www.maikonline.com/maik/showArticle.do?aud=VAHQJ2REDV> (перечень Scopus, WoS, BAK), автора – 0.0625 пл.
3. Abdul-Hafeez E. Y., **Nguyen T.N.**, Karamova N.S., Ilinskaya O.N. Antibacterial activity of certain medicinal plants on different bacterial strains associated with colorectal cancer // Int. J. Biosci. – 2014. – V. 5, № 7. – P. 219-229. <http://dx.doi.org/10.12692/ijb/5.7.219-229>, (перечень Scopus, BAK) автора – 0.17 пл.
4. Yesuf Siraj, **Nga Nguyen**, Pavel Zelenikhin, Eugeniya Sokolova, Ilgiz Gataullin, Olga Ilinskaya. Dysbiosis of Cultivable Aerobic Microbiota Tightly Associated with Colon Cancer Epithelial Cells // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2015. – V. 6, № 5. – P. 1658-1663 (перечень Scopus, BAK) автора – 0.075 пл.
5. **Нгуен, Н. Т.** Молекулярно-генетический анализ микроорганизмов с внутриэпителиальной инвазией, выделенных от больных колоректальным раком / Н.Т. Нгуен, Р.Р. Вафин, И.В. Ржанова, А.И. Колпаков, И.Г. Гатауллин, С.В. Тюлькин, М.Н. Синягина, Т.В. Григорьева, О.Н. Ильинская // Молекулярная генетика, Микробиология и Вирусология. – 2016. - № 1. – С. 22-27 (перечень Scopus, BAK) автора – 0.05 пл.

Тезисы конференций

6. **Nguyen, T.N.** The special features of colon epithelial microflora by colorectal cancer / Nga Thi Nguyen, I.G.Gataullin, O.N. Ilinskaya // Abstracts of International Conference On Bioorganic Chemistry, Biotechnology And Bionanotechnology dedicated to the 55th Anniversary of the M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences and the 80th Anniversary of Professor Yuri Ovchinnikov, Russia, Moscow. 2014. Acta Naturae - Special issue – P. 35-36.
7. **Nga Nguyen**. Culturable aerobic microbiota tightly associated with colon cancer epithelial cells / **Nga Nguyen**, Pavel Zelenikhin, Ilgiz Gataullin, Yesuf Siraj, Olga Ilinskaya // Abstract of The 6th Congress of European Microbiologists (FEMS 2015), Maastricht, Netherlands. 7-11 June 2015.
8. **Нгуен, Т. Н.** Рибонуклеолитическая активность бактериальной микрофлоры эпителия прямой кишки как природный фактор противодействия опухолеобразованию / Нгуен Тхи Нга // Материалы Всероссийской школа-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века», КФУ, Казань. 2014. - С. 51
9. **Nguyen Thi Nga**. Role of intestinal microflora in development colorectal cancer / Nguyen Thi Nga, Gataullin I.G., Ilinskaya O.N. // Материалы IV Международной научно-практической конференции "Новые концепции механизмов воспаления, аутоиммунного ответа и развития опухоли". КГМУ, Казань. 2014. – С. 88-90

10. Валеева, А.М. Рибонуклеазная активность микрофлоры колоректальной карциномы и немалигнизированного эпителия прямой кишки / А.М. Валеева, **Нгуен Нга**, А.В. Макеева, П.В. Зеленихин // Микробиология в современной медицине: Материалы всероссийской заочной научно-практической конференции с международным участием, Казань. 16 марта 2013 г. – С. 78-80
11. Пуховская, В.С. Биназа вызывает избирательный апоптоз клеток малигнизированного эпителия легких / В.С. Пуховская, **Т.Н. Нгуен**, А.В.Макеева, А.А.Несмелов, П.В.Зеленихин // Материалы V Всероссийского с международным участием медико-биологического конгресса молодых ученых "Симбиоз-Россия 2012", Тверь. 03-08 декабря 2012. – С. 257-258.

Е-mail автора: nn7189@gmail.com

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: 420008, Казань, ул.Кремлевская, 18, главное здание Казанского федерального университета, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю Диссертационного совета Д 212.081.08 Абрамовой Зинаиде Ивановне, факс: (843) 238-76-01.

Е-mail: ziabramova@mail.ru.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

КРР	Колоректальный рак
РНКаза	Рибонуклеаза
ЖКТ	Желудочно-кишечный тракт
ТМТ-Н	циклический гидроксилламин N-(1-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-4-ил)-2-метилпропанамида гидрохлорид
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	Рибонуклеиновая кислота
ЕРЕС	энтеропатогенные <i>E. coli</i>
ЕНЕС	энтерогеморрагические <i>E. coli</i>
ЕТЕС	энтеротоксигенные <i>E. coli</i>
ЕАЕС	энтероагрегативной <i>E. coli</i>
ЕІЕС	энтероинвазивные <i>E. coli</i>
ДАЕС	диффузно прилипающий <i>E. coli</i>
БФС	синтетическая бесфосфорная среда
АФК	Активные формы кислорода
ЭПР	Электронный парамагнитный резонанс